

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biitekniikka

2012

Henry Hietanen

KROONISTEN TULEHDUKSELLISTEN SUOLISTOSAIRAUKSIEN ELÄINMALLIN VALIDOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Tekijä: Henry Hietanen

KROONISTEN, TULEHDUKSELLISTEN SUOLISTOSAIRAUKSIEN ELÄINMALLIN VALIDOINTI

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida eläinmalli tulehduksellisille kroonisille suolistosairauksille.

Tulehdukselliset krooniset suolistosairaudet (Inflammatory bowel disease, IBD) ovat varsinkin Suomessa ja muissa länsimaissa kasvava ongelma. Tauti on ikävä sekä fyysisten oireiden, että lieveilmiöiden, kuten työkyvyttömyyden ja yleisen elämänlaadun heikkenemisen johdosta. Diagnooituja tautitapauksia on Suomessa noin 20 000 ja vuosittain tehdään lähes 1000 uutta diagnoosia. Tautiin ei ole vielä kehitetty parantavaa lääkitystä.

Tulehduksellisiin kroonisiin suolistosairauksiin yritetään kehittää uusia lääkkeitä ja, kuten kaikkia lääkkeitä, täytyy niitä ennen kliinisiä kokeita testata ensin eläimillä.

Tämän opinnäytetyön toimeksiantaja Toxis Ltd. Oy halusi validoida hiirimallin, jolla voidaan tutkia lääketeiden vaikutusta IBD:hen. Validoinnilla haluttiin osoittaa, että hiirelle pystytään indusoimaan suolistotulehdus ja tulehduksen voimakkuutta pystytään monitoroimaan pisteyttämällä painon, ulosteen ja paksusuolen muutoksia.

Aikaisempien tutkimusten perusteella validoitavaksi hiirikannaksi valittiin sisäsiittoinen albiinohiiri BALB/c. Tulehdus indusoiitiin antamalla hiirille eri pitoisuuksia dextraaninatriumsulfaattia eli DSS:ää juomaveteen liuotettuna. DSS-pitoisuudet olivat 2 % ja 5 %. Indusointiajoiksi valittiin 5 vrk ja 7 vrk. Hiirien painoa, juomaveden ja DSS:n kulutusta sekä ulosteen koostumusta seurattiin päivittäin. Kokeen päättymisen jälkeen hiirten paksusuolet tutkittiin makroskooppisesti ja kerättiin talteen.

Validoinnilla pystyttiin osoittamaan, että DSS:llä saadaan indusoitua BALB/c hiirille IBD:tä vastaava paksusuolen tulehdusreaktio. Validoinnilla pystyttiin määrittämään sopiva DSS:n pitoisuus ja testiajan pituus, siten että hiirten kunto pysyy hyvänä. Validoinnilla pystyttiin myös osoittamaan, että mitatun datan perusteella tehdyllä pisteytyksellä voidaan tulehduksen voimakkuus määrittää luotettavasti.

Validointi onnistui ja hiirimallia voidaan käyttää lääkkeen tehon osoittamiseen tutkimuksissa.

ASIASANAT: Validointi, eläinmalli, IBD, hiiri, Crohnin tauti, haavainen paksusuolentulehdus

Henry Hietanen

VALIDATION OF ANIMAL MODEL FOR INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

The purpose of this thesis was to validate an animal model for human inflammatory bowel disease.

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of chronic bowel diseases. The two main diseases are Crohn's disease and ulcerative colitis. IBD is mainly found in the Occident and the number of diagnoses is growing. IBD is lamentable disease which is reflected in multiple ways in life quality. In Finland there are 20 000 diagnosed patients and every year, 1000 new diagnoses are made.

No curing medicine has been developed for IBD. There are drugs under development and like always every new drug ingredient must be tested in animals before clinical testing.

The commissioner of this thesis, Toxis Ltd. Oy, wanted to validate a mouse model for human IBD drug testing. With validation, the commissioner wanted to demonstrate that bowel inflammation can be induced into mice and the rate of inflammation can be monitored by changes in weight, fecal bleeding, and consistency of feces.

Based on previous studies, the inbred albino mouse BALB/c strain was selected for the model. Inflammation was induced with dextran sodium sulfate (DSS). Powdery DSS was dissolved in tap water of two concentrations, 2 % and 5 %, when the induction periods were 5 and 7 days. Mice weight, water intake, DSS intake, consistency of feces and welfare of mice were monitored daily. The colons were collected and macroscopically examined after the test period.

This thesis proves that colitis similar to human IBD can be induced in mice with DSS. The rate of inflammation can be evaluated reliably by monitoring fecal changes. The correct induction period (7 days) and DSS concentration (5 %) were determined.

The validation succeeded and the model can be used in drug testing for IBD.

KEYWORDS: Validation, animal model, IBD, mouse, Crohn's disease, ulcerative colitis

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
1.1 Eläinkokeet	6
1.2 Laboratoriohiiri	7
1.2.1 Hiiren biologiaa	8
1.2.2 Lisääntyminen	8
1.2.3 Hoito	9
1.2.4 Hiiren käyttäytyminen	10
2 TULEHDUKSELLISET, KROONISET SUOLISTO-SAIRAUDET	11
2.1 Oireet	11
2.1.1 Haavainen koliitti	11
2.1.2 Crohnin tauti	12
2.2 Diagnosointi	12
2.3 Taudin aiheuttaja	12
2.4 Hoito	13
2.5 Esiintyvyys	14
2.6 IBD:n historiaa	14
2.7 IBD:n vaikutus elämänlaatuun	14
3 TUTKIMUKSEN MATERIAALIT JA MENETELMÄT	16
3.1 Eläimet ja fasiliteetit	16
3.2 Tutkimuksen kulku	17
3.2.1 Indusoinnin aloitus	17
3.2.2 Kokeen aikana tehdyt toimenpiteet	17
3.2.3 Ulosteen arviointi	18
3.2.4 Kokeen lopetus	19
4 TULOKSET	21
4.1 Painonkehitys	21
4.2 Vedenkulutus	22
4.3 DSS:n kulutus	23
4.4 Tulehdusoireet	24
5 JOHTOPÄÄTÖKSET	26
5.1 Painonkehitys	26

5.2 Vedenkulutus	26
5.3 DSS:n kulutus	27
5.4 Tulehdusoireet	27
5.5 Loppupäätelmät	28

LIITTEET

Liite 1. Hemocult®-kitin ja visuaalisten havaintojen vertailu.

KUVAT

Kuva 1. Laboratoriohiiriä.	10
Kuva 2. Terve ja tulehtunut paksusuoli.	20

KUVIOT

Kuvio 1. Painon muutokset.	21
Kuvio 2. Vedenkulutus.	22
Kuvio 3. DSS:n kulutus.	23
Kuvio 4. Ulosteen yhteenlasketut pisteet.	24
Kuvio 5. Lopetuspäivän tulehdusindeksi.	25
Kuvio 6. Paksusuolen pituus-painosuhteet.	25

TAULUKOT

Taulukko 1. Eläinnumerot ja ryhmät.	17
Taulukko 2. Painon ja tulehdusindeksin suhteet	26

KÄYTETYT LYHENTEET

IBD	Inflammatory bowel disease, tulehdukselliset, krooniset suolistosairaudet
CD	Crohn´s disease, Crohnin tauti
UC	Ulcerative colitis, haavainen koliitti
DSS	Dextran Sodium Sulfate, dextraani-natriumsulfaatti

1 JOHDANTO

1.1 Eläinkokeet

Eläinkoe tarkoittaa suunniteltua kokeellista toimenpidettä, jolla pyritään selvittämään eläimen elimistön normaalia toimintaa tai sen muutoksia. Eläinkokeiden tarkoitus on tutkia, hoitaa ja ehkäistä ihmisen ja eläinten sairauksia. Lääkekehityksen alkuvaiheessa uusia lääkeaineita ei saa testata kliinisesti, ennen kuin niiden turvallisuus on varmistettu eläinkokeilla.^{1,2}

Ensimmäiset arkistoidut eläinkokeet on tehty antiikin Kreikassa yli 2000 vuotta sitten. Eläinkokeiden eettisen oikeutuksen määrittelemisessä pohditaan eläimelle aiheutuvan kärsimyksen suuruutta suhteessa kokeella saavutettavaan tutkimustietoon. Jos tutkimustieto on mahdollista saavuttaa *in vitro*-menetelmin, ei eläinkoetta tehdä. Eläinkokeissa tutkitaan yleensä koko elion tai elimistön toimintaa, kuten tässä työssä ruuansulatuselimistöä, jolloin solutason tutkimuksella ei voida saada luotettavaa tietoa. Niin eläinkokeiden kritisoijat kuin tutkijatkin pyrkivät siihen, että eläimille aiheutuu mahdollisimman vähän kärsimystä. Jos eläimet kokevat merkittävää kipua, heijastuu se negatiivisesti myös tutkimustuloksiin ja niiden luotettavuuteen.^{1,2}

Viimeisten kahden vuosikymmenen aikana koe-eläinlainsäädäntö on kiristynyt huomattavasti. Eläinkoetoiminta on nykyään Suomessa ja muissa kehittyneissä maissa hyvin tarkoin säädeltyä. Vuonna 2010 astui voimaan EU:ssa uusi direktiivi koe-eläintoiminnasta. Direktiivin tarkoituksena on yhtenäistää koe-eläintoimintaa unionin jäsenmaissa. Eläinkokeeksi määritellään toimenpide, jossa eläimille voi aiheutua vähintään neulanpiston aiheuttamaan tuntemukseen verrattavaa kipua, tuskaa, kärsimystä tai pysyvää haittaa. Suomessa kaikille eläinkokeille on haettava lupa eläinkoelautakunnalta. Lautakunta muodostuu tutkijoista, eläinlääkäreistä, eläinten hoidon asiantuntijoista ja eläinten suojelun tai etiikan asiantuntijoista. Kaikilla neljällä asiantuntijaryhmällä on

lautakunnassa 25 % edustus. Tämän kokeen eläinkoelautakunnan myöntämän luvan numero on ESAVI -5156.-04.10.03.2011.^{1,2,3,4}

Kokeesta ja eläimistä saadaan yleensä sekä subjektiivisia, kuten visuaaliset havainnot, että absoluuttisia, kuten eläimen paino, havaintoja. Ei numeeriset havainnot muutetaan ennakkoon päätetyn periaatteen mukaisesti numeeriseen muotoon. Eri havainnoista lasketaan kokeen tyypistä riippuen indeksi, jonka avulla eri testiryhmiä voidaan verrata järkevästi. Kun havainnot esitetään kuvaajana, voidaan helposti nähdä ja osoittaa testin vaikutuksia eläimiin. Tärkein ja eläinkokeissa yleisimmin käytetty seurantamääre on eläimen paino. Vaikka kyseessä olisi koe, jossa eläimeen ei induoida tautimallia, vaan esimerkiksi kinetiikkakoe, seurataan painonkehitystä silti eläimen hyvinvoinnin mittarina. Eläinkoelupahakemuksessakin täytyy esittää turvarajat eläimen painonmuutosten suhteen; eli kuinka suuren painonpudotuksen jälkeen eläin lopetetaan kokeen vaiheesta riippumatta eettisten syiden perusteella.

Tässä työssä kerättiin painon lisäksi tietoa vedenkulutuksesta, ulosteen koostumuksesta ja verisyydestä, paksusuolen punaisuudesta ja paino-pituussuhteesta sekä eläimen yleisestä hyvinvoinnista. Jokaisen häkin viisi hiirtä joivat samasta pullosta, joten vedenkulutus mitattiin häkkiä kohden. Paino ja ulosteen määritykset tehtiin jokaiselle hiiriyksilölle erikseen, mutta tuloksiin ne laskettiin ryhmittäin yhteen tai otettiin ryhmän keskiarvo.

1.2 Laboratoriohiiri

Tässäkin tutkimuksessa käytettävästä laboratoriohiirestä (*Mus musculus*) on tullut eniten käytetty koe-eläin. Hiiren käyttö koe-eläimenä aloitettiin 1600-luvulla Englannissa kuuluisan lääkärin William Harveyn toimesta. Mendelin perinnöllisyyslakien keksimisen jälkeen 1900-luvun alussa tutkijat ja hiiriharrastajat kehittivät useita hiirikantoja ja hiiri vakiintui kokeellisen tutkimuksen eläinmalliksi. Yksi hiiren suurista eduista on pienen koon ja sopeutuvaisuuden mukanaan tuoma ekonomisuus. Hiiret lisääntyvät tehokkaasti, tarvitsevat vähän elintilaa ja kuluttavat vain vähän ruokaa ja vettä.

^{5,6}

1.2.1 Hiiren biologiaa

Laboratoriohiiriä on jalostettu useita satoja kantoja. Eri kannat eroavat kooltaan, väriltään ja muilta ominaisuuksiltaan toisistaan. Yleensä aikuinen laboratoriohiiri on 12-14 cm pitkä ja painaa 20-40 g. Laboratoriohiiren elinikä on kannasta riippuen ½-3 vuotta.^{5,6}

Hiiren näkökyky on heikko ja keskittynyt hämäränäköön; värinäön mahdollistavia tappisoluja on hyvin vähän, ja siksi hiiret näkevät varsinkin punaisia sävyjä huonosti. Hiiren kuuloaisti on vahva. Se pystyy kuulemaan ultraääniä ja hiiren herkin kuuloalue alkaa taajuuksista, joissa ihmisen kuulo on aivan äärialueillaan. Tämä on tärkeää ottaa huomioon laboratoriossa, koska ihmisen korvaan täysin äänetön tila, voi olla hiirelle tuskallisen meluisa. Hiirellä on myös hyvä hajuaisti. Hiiret kommunikoivat kemiallisesti erittämällä virtsaan feromoneja. Feromonit ovat yhdisteitä, jotka hajuaistin välityksellä vaikuttavat aivolisäkkeeseen ja ovat sitä kautta tärkeässä osassa muun muassa hiirten hormonaalisessa toiminnassa.⁵

Hiirillä on jyrsijöille tyypilliset jatkuvasti kasvavat etuhampaat, jotka toispuolisen kiilteen ansiosta pysyvät aina terävinä. Hiirillä on viisi teräväkyntistä varvasta jokaisessa käpälässä. Hiiren häntä on noin puolet sen pituudesta. Karvatonta häntäänsä hiiri käyttää pääasiassa tasapainon hallinnassa ja ruumiinlämmön säätelyssä.⁵

1.2.2 Lisääntyminen

Hiiret ovat nisäkkäiksi erittäin tehokkaita lisääntymään. Yhden poikueen koko voi olla yli kymmenen yksilöä. Hiirinaaraat tulevat sukukypsiksi 7-9 viikon ikäisinä ja urokset 9-11 viikon iässä. Tiineysaika on kolme viikkoa ja hiirinaaras voi parhaimmillaan tulla tiineeksi alle viikon kuluttua edellisestä synnytyksestä. Hiiren estruskierto kestää 4-5 vuorokautta ja kiima 12 tuntia. Parittelu voidaan havaita naaraan vaginaan muodostuvasta uroksen sperman eritteistä koostuvasta tulpasta.⁵

Tiineeksi tulleet naaraat alkavat rakentaa pesää, pesämateriaaliksi kelpaa esimerkiksi pehmeä paperi. Pienet, noin kahden gramman painoiset poikaset syntyvät yöaikaan. Synnytyksen jälkeen emo syö istukan ja nuolee poikaset puhtaiksi. Jos synnytystä häiritään tai poikasia käsitellään ja palautetaan pesään, saattaa naaras syödä poikaset. Toisaalta, naaras saattaa ottaa hoidettavakseen myös vieraita poikasia, jos poikasiin hierotaan naaraan oman pesän hajua. Hiiripoikaset ovat syntyessään varsin kehittymättömiä; ne ovat karvattomia ja silmät aukeavat vasta kahden viikon iässä. Emo imettää poikasia kolme viikkoa ja tämän jälkeen poikaset voidaan vieroittaa.⁵

1.2.3 Hoito

Laboratoriohiirten käsittelyssä tulee ottaa huomioon, että ne ovat hyvin pieniä ja hentorakenteisia; ihminen pystyy helposti murtamaan hiiren selkärangan sormillaan tai puristamaan sisäelimet hajalle. Vaikka hiirten käsittelyn tulee siis olla hellävaraista, täytyy sen myös olla varmaotteista. Kömpelösti käsiteltynä hiiri saattaa purra käsittelijäänsä. Koska hiiri on kevyt ja sillä on kokoonsa suhteutettuna vahva häntä, voidaan hiiri nostaa ja kuljettaa lyhyitä matkoja ottamalla kiinni hännän tyvestä. Hiiri saadaan immobilisoitua keräämällä löysä selkänahka peukalon ja etu- ja keskisormen väliin ja häntä nimettömän ja pikkurillin väliin.⁵

Eläinkoeasettelussa on usein hyvin tärkeää saada hiiret yksilöityä. Kokeissa joissa on pitkät käsittelyvälit, voidaan hiiret merkintä tatuoinnilla tai korvamerkillä. Lyhyemmissä kokeissa voidaan merkintä tehdä tussilla häntään, värjäämällä turkkia tai leikkaamalla turkista pieni alue. Tussimerkintöjä täytyy uusua päivittäin ja karva kasvaa takaisin kahdessa viikossa. Jos hiiriä pidetään isolaattorissa tai ne halutaan muuten tunnistaa etänä, voidaan niiden ihon alle kiinnittää mikrosiru, jonka avulla hiiret voidaan tunnistaa varmasti myös häkin ulkopuolelta.⁵

Hiiri on kaikkiruokainen mutta suosii viljatuotteita. Laboratoriohiirille annetaan jyrsijöille suunniteltua pellettirehua. Rehu on yleensä valmistettu viljasta, kasviöljystä, soijasta, kalasta ja maitojauheesta. Erityyppisten koeasetelmien

vuoksi on käytössä myös lukuisia erikoisrehuja. Juomaksi hiirille annetaan useimmiten tavallista vesijohtovettä. Joskus, esimerkiksi isolaattorikasvatuksessa, saattaa olla tarpeen antaa hiirille vesijohtovettä puhtaampaa käänteisosmoosi- tai steriilisuodatettua vettä.⁵



Kuva 1. Laboratoriohiiriä. Copyright Toxis Ltd Oy.

1.2.4 Hiiren käyttäytyminen

Hiiret ovat sosiaalisia ja uteliaita eläimiä. Ne saattavat myös, kannasta riippuen, olla hyvinkin aggressiivisia. Laboratoriohiiret tulevat parhaiten toimeen sisaruksista koostuvissa ryhmissä. Hiiret ovat yöaktiivisia eläimiä, joten automatisoitu valo-pimeärytmitys laboratoriossa on tärkeää. Hiiret tykkäävät kiipeillä ja kaivautua. Hiiret änkevät myös mielellään läpi ahtaista koloista, kuten huonosti kiinnitetyn koe-eläinlaatikon kannen välistä.⁵

2 TULEHDUKSELLISET, KROONISET SUOLISTO-SAIRAUDET

Tässä opinnäytetyössä validoitiin hiirimalli, jolla pystytään tutkimaan ihmisen tulehduksellisia, kroonisia suolistosairauksia eli IBD:tä varten kehitettäviä lääkkeitä. IBD:n päätyypit ovat Crohnin tauti, CD, ja haavainen koliitti, UC. Tautien oireet ovat samankaltaisia ja noin 10:ssä %:ssa tautitapauksista ei voida varmuudella diagnosoida kummasta taudista on kyse, jolloin puhutaan määrittelemättömästä koliitista, IC.⁷

2.1 Oireet

Tautien yleisimmät oireet ihmisellä ovat limainen ja/tai verinen ripuli sekä vatsakivut ja –krampit. Muita oireita voivat olla kuumeilu, anemia, painonlasku, iho-ongelmat, ummetus, yöhikoilu, ruokahaluttomuus ja kasvuhäiriöt. Tulehdus voi levitä myös muihin kuin ruoansulatuselimiin, kuten maksaan, ihoon, silmiin ja niveliin. Oireet vaihtelevat tulehduksen rajuuden ja sijainnin mukaan. Myös perinteisten aitojen esiintyvyys kasvaa IBD:tä sairastavien keskuudessa.^{7,8,9}

2.1.1 Haavainen koliitti

Haavaisessa koliitissa tulehdus on yleensä perä- ja paksusuolen alueella ja harvoin ohutsuolen loppupäässä tai peräaukossa. Tulehdusalue on yhtenäinen ja suolesta tulehtuu vain pinta- eli limakalvokerros. Myös haavaumat rajoittuvat limakalvokerrokseen. Haavaumat ovat usein vertatihkuvia ja sitä kautta myös uloste on usein veristä. Koepaloista löytyy lähes aina umpirakkuloita mutta

granuloomia vain harvoin. UC voidaan jaotella neljään vakavuusasteeseen ulostustiheyden, ulosteen koostumuksen sekä muiden oireiden perusteella.⁷

2.1.2 Crohnin tauti

Crohnin taudissa tulehdus voi esiintyä missä tahansa ruuansulatuselimistössä, aina suusta peräaukkoon. Tulehduksen yleisin sijainti on ohutsuolen loppuosassa. Tulehdusalue ei ole yhtenäinen vaan tulehdusalueita on useita. Tulehdus on transmuraali, eli se koskee koko suolta, eikä vain limakalvoa, kuten haavaisessa koliitissa. Haavaumat ovat syviä ja onkalomaisia. Haavaumat tihkuvat verta UC:tä harvemmin. CD:ssä esiintyy UC:tä useammin fisteleitä ja enterostenooseja. Koepaloissa esiintyy usein granuloomia mutta umpirakkuloita vain harvoin. 2/3:ssa tautitapauksia tauti on aaltoilevaa, eli oireet pahenevat ja sitten taas lievenevät, kun taas 1/3:ssa oireet ovat jatkuvia.^{7,8}

2.2 Diagnosointi

Diagnosoinnissa voidaan käyttää hyväksi ulostetutkimuksia, joissa tutkitaan neutrofiiliperäisten kalprotektiinin ja laktoferriinin pitoisuuksia. Diagnosoinnissa käytetään erilaisia tähystystutkimuksia, suoliston loppuosalle anaalitähystystä ja alkuosalle nieltäviä langattomia kamerakapseleita. Serologiset tutkimukset, joissa tutkitaan tiettyjen vasta-aineiden pitoisuuksia seerumissa, ovat myös osoittautuneet erinomaisiksi diagnosointivälineiksi.^{9,9}

2.3 Taudin aiheuttaja

IBD:tä ei indusoi mikään tietty mikrobi eikä sen syntymis- ja puhkeamissyitä vielä kunnolla tunneta. Tutkimukset ovat osoittaneet tiettyjen geenien

vaikuttavan taudin syntymiseen. Tauti on keskittynyt teollisuusmaihin, joten elämäntavoilla oletetaan olevan vaikutusta taudin syntyyn. Kyseessä on siis ainakin osittain perinnöllinen autoimmuunisairaus, jossa ruuansulatuselimistön epiteeleissä immuunijärjestelmä reagoi voimakkaasti jotain makromolekyyliä vastaan ja tulehdus ei rauhoitu, vaan jää päälle kroonisesti. IBD ei voi siis tarttua ihmisestä toiseen. Geneettiset tekijät vaikuttavat enemmän CD:n kuin UC:n syntyyn. Geeni CARD15 ja sen kolme yleistä mutaatiota oli ensimmäinen CD:hen yhdistetty perinnöllinen tekijä, joka keksittiin vuonna 2001. Esimerkkejä muista IBD:hen vaikuttavista geeneistä ovat IL23R, joka vaikuttaa CD:hen ja TNFRSF1A, joka taas vaikuttaa UC:hen. Perinnölliset vaikutukset taudin syntyyn vaihtelevat maantieteellisesti merkittävän paljon.⁷

2.4 Hoito

IBD:n hoidon tavoitteena on oireettomuus sekä taudin uusiutumisen ja komplikaatioiden esto. Lääke- tai leikkaushoidolla pyritään aluksi remission induktioon eli tulehduksen laannuttamiseen ja tämän jälkeen saavutetun remission ylläpitämiseen eli pitämään tulehdus aisoissa. IBD:n hoitoon käytettyjä lääkkeitä ovat kortisonilääkkeet, siklosporiini, atsatiopriini, metronidatsoli, siprofloksasiini, sulfasalatsiini, mesalatsiini ja oksalatsiini. Uusia hoitomuotoja ovat biologiset hoidot, kuten valkosolujen suodatushoito ja vasta-ainelääkitys, esimerkiksi infliksimabi. Leikkaushoitoon turvaudutaan, jos tulehdus on aiheuttanut tukoksen tai muun vaarallisen akuutin vaivan tai lääkehoidoilla ei saavuteta remissiota. UC:ssä leikkauksella, jossa poistetaan koko tulehdusalue eli perä- ja paksusuoli, voidaan tauti saada poistettua

kokonaan. CD:ssä leikkaushoidolla ei ole samanlaista parantavaa vaikutusta ja leikkaus täytyykin uusida yli 50 %:ssa tapauksia.^{8,9,10}

2.5 Esiintyvyys

IBD on huomattavasti yleisempää kehittyneissä yhteiskunnissa kuin kehitysmaissa. IBD jakautuu tasaisesti sukupuolten välillä. Suomessa taudin esiintyvyys on 300-400 sairastunutta 100 000:ta kohden. Suomessa esiintyy muista länsimaista poiketen hieman enemmän UC:tä kuin CD:tä; CD:n ilmaantuvuuden kasvu on kuitenkin nopeampaa. Yhteensä uusia tautitapauksia tulee vuosittain 15-20 100 000:ta kohden.^{7,8}

2.6 IBD:n historiaa

Vuonna 1859 Sir Samuel Wilks kuvasi ensimmäisen kerran UC:n oireet. Vuonna 1875 Wilks ja Walter Moxon huomasivat, että tauti ei ole infektioperäinen. Jo tuolloin eroteltiin CD ja UC eri taudeiksi. 1913 Thomas Kennedy Dalziel raportoi 13 tautitapauksesta, joiden ruumiinavauksissa löytyi kaikista transmuraalisti tulehtunutta suolta. Uusia samankaltaisia tautitapauksia ilmeni nuorilla aikuisilla ja 1932 Crohn, Oppenheimer ja Ginsberg julkaisivat tutkimuksensa, josta Crohnin tauti on saanut nimensä. Perimän vaikutus taudin syntyyn on alkanut selkiintyä vasta viime aikoina ihmisen genomin sekvensoinnin jälkeen.⁷

2.7 IBD:n vaikutus elämänlaatuun

IBD negatiivinen vaikutus elämänlaatuun on voimakkaimmillaan taudin aktiivivaiheessa. Suomalaista IBD:tä sairastavista potilaista kolmannes kertoo kärsivänsä viikoittain taudin oireista ja 1/8 kertoo oireiden vaikuttavan huomattavasti työkykyyn. Tuoreen diagnoosin saaneiden ja juuri leikkauksessa olleiden potilaiden elämänlaatu kärsii eniten IBD:stä. IBD heikentää keskimäärin

enemmän naisten kuin miesten elämänlaatua. IBD:tä sairastavilla on sairastamattomiin verrattuna enemmän myös muita pitkäaikaissairauksia, jotka heikentävät elämänlaatua entisestään.¹¹

3 TUTKIMUKSEN MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Eläimet ja fasilitetit

Aiemmin julkaistujen artikkelien perusteella tutkimuksessa päätettiin käyttää koe-eläiminä hiiriä. Myös hamstereille on tehty suolistotulehdus-malleja, mutta tulehdusreaktio on niillä niin voimakas, että sitä pidettiin eettisesti arveluttavana. Eri hiirikannoista päädyimme sisäsiittoisiin BALB/c uroshiiriin, jotka tuotti ja toimitti ranskalainen Harlan.^{12,13,14,15,16}

Eläimet toimitettiin 8 päivää ennen kokeen alkua, jotta ne ehtivät sopeutua uusiin eläintiloihin. Hiiriä toimitettiin 50 kappaletta ja ne olivat noin 8 viikon ikäisiä ja painoivat 15-25 grammaa. Hiiret jaettiin niiden saapuessa satunnaisesti 10 häkkiin, 5 eläintä per häkki. Häkkityyppinä käytettiin Macrolon II-häkkiä, joka on polykarbonaatista valmistettu standardi hiirihäkki. Häkeissä käytettiin teräksisiä ritiläkansia. Eläimet saivat vesijohtovettä juomapullosta ja jyräjärehua (Teklad Global 16 % Protein Rodent Diet, erä 060311M)¹⁷ häkin kannen lävitse *ad libitum*. Kuivikkeena häkkien pohjalla oli Tapvein toimittamaa leppähaketta ja lisäksi saman toimittajan pesämateriaalia. Kokeen alkamista edeltävänä päivänä hiiret yksilöitiin häntämerkinnällä. Numerointi tehtiin nousevasti ryhmien mukaan. Kontrolliryhmässä oli 5 5 vrk:n ja 5 7 vrk:n testiajan hiirtä. Testiaineryhmissä ryhmäkoko oli 10 hiirtä. Ryhmät ja eläinnumerot esitetty alla, Taulukko 1. Eläinten häkkeihin kiinnitettiin häkkikortit, joista selvisi häkissä olevien eläinten laji, kanta, sukupuoli, määrä, eläinnumerot, ryhmä, kokeen kesto, testiaineen konsentraatio, tutkimusnumero, lupanumero ja tutkimuksen johtaja. Eläinhuoneessa oli ohjelmoitu 12h / 12h valo-pimeärytmi. Eläinhuoneen lämpötila oli säädetty 21±3 °C-asteeseen ja ilman suhteellinen kosteus 55±15 %:iin.

Taulukko 1. Eläinnumerot ja ryhmät.

Eläinnumero	Ryhmä	Testiaika	DSS-pitoisuus
1-5	#1	5 vrk	0 %
6-10	#1	7 vrk	0 %
11-20	#2	5 vrk	2 %
21-30	#3	5 vrk	5 %
31-40	#4	7 vrk	2 %
41-50	#5	7 vrk	5 %

3.2 Tutkimuksen kulku

3.2.1 Indusoinnin aloitus

Tutkimuksessa päätettiin käyttää indusointiaineena MP Biomedicals:n toimittamaa dekstraaninatriumsulfaattia (DSS). DSS indusoi tulehduksen käynnistämällä suolen limakalvolla tulehdusvälittäjäaineiden tuoton. DSS aiheuttama tulehdus vastaa lähinnä UC:n oireita. DSS:ää voidaan antaa oraalisesti juomaveteen sekoitettuna. Jauhemainen DSS liuotettiin vesijohtoveteen. Testiainepitoisuudet olivat 2 % w/v ja 5 % w/v. Liuostilavuudet olivat pieniä, joten valmis testiaineliuos jaettiin normaalia pienempiin kapeisiin juomapulloihin. Jokaiseen pulloon merkittiin liuosvahvuus ja mille eläimille se oli tarkoitettu. Hiiret punnittiin yläkuppivaa'alla punnituslaatikossa ja samalla tarkastettiin niiden kunto sekä vahvistettiin häntämerkintöjä. DSS-pullot ja kontrolliryhmien vesipullot punnittiin kulutuksen seuraamiseksi. Punnitusten jälkeen vaihdettiin häkkien vesipullot DSS-pulloihin, pois lukien kontrolliryhmät, joiden häkkeihin jätettiin alkuperäiset vesipullot.¹⁸

3.2.2 Kokeen aikana tehdyt toimenpiteet

Aamuisin hiiret punnittiin ja tarvittaessa niiden häntämerkintöjä vahvistettiin. Samalla tarkastettiin hiirten kunto silmämääräisesti sekä punnittiin juomapullot

ja arvioitiin uloste. Eläimet saivat normaalisti ruokaa koko tutkimuksen ajan, kolmantena testipäivänä eläintenhoitajat täydensivät rehukaukaloita.

3.2.2.1 Hiirten punnitseminen

Hiiret oli yksilöity ja ne punnittiin yksitellen, jolloin painonkehitystä voitiin seurata yksilötasolla. Punnituksen ajaksi hiiri nostettiin yläkuppivaa'an päällä olevaan pieneen laatikkoon. Vaa'assa käytettiin eläinpunnitusmetodia, joka ottaa sekunnin välein kolme punnitustulosta ja ilmoittaa niiden keskiarvon, jolloin saadaan minimoitua hiiren liikkeistä syntyvä virhe. Hiirten ja hiiriryhmien painot olivat keskenään erisuuria, joten tuloksissa painonmuutos esitetään prosentuaalisena muutoksena kokeen alkuun.

3.2.2.2 Vedenkulutuksen mittaus

Vedenkulutuksen ja sitä kautta testiaineen kulutuksen määrä mitattiin vesipulloja punnitsemalla. Jokaisen häkin vesipullo punnittiin 24h periodeissa. Vedenkulutus laskettiin jakamalla kulutettu vesi häkissä olevien hiirten yhteispainolla, jolloin tulokseksi saadaan kulutus grammaa vettä per gramma hiirtä. Juomapulloista tippui häkin pohjalle muutama tippa nestettä aina pulloa pois otettaessa sekä takaisin laitettaessa. Tästä johtuvan virheen vakioimiseksi sama henkilö otti kaikki juomapullot häkeistä sekä laittoi ne takaisin.

3.2.3 Ulosteen arviointi

Hiiriltä otettiin punnituksen yhteydessä ulostenäyte. Tulehdusoireita tarkkailtiin päivittäin tutkimalla visuaalisesti ulosteen koostumusta ja mahdollisen veren esiintymistä ulosteessa tai anuksen ympärillä. Visuaaliset havainnot esitettiin numeerisessa muodossa vertailun helpottamiseksi. Ulosteen koostumus eli kiinteys jaettiin neljään kategoriaan: 0=normaali kuiva ja kova uloste, 1=kuiva mutta hieman pehmenyt uloste, 2=pehmeä ja kostea uloste, 3=nestemäinen uloste. Ulosteen verisyys jaettiin myös neljään asteeseen: 0=ei verta, 1=pieni pisara verta, 2=useampi pisara verta, 3=hyvin verinen uloste. Lopetuspäivänä ulostenäyte tutkittiin veren paljastavalla kitillä (Hemoccult®, Beckman Coulter

Inc. USA), jolla tutkittiin visuaalisen ja kemiallisen havainnoinnin korrelaatiota, Liite 1. Hemocult®-kitin ja visuaalisten havaintojen vertailu.

3.2.4 Kokeen lopetus

Viiden päivän kuluttua lyhyemmän, eli viiden vuorokauden, testiajan hiiret lopetettiin. Ennen lopetusta hiiret punnittiin. Lopetuksen yhteydessä eläimiltä otettiin kaksi ulostenäytettä. Koostumus arvioitiin edelleen visuaalisesti, mutta verisyys tutkittiin tarkoituksen mukaisten kittien avulla. Hiiret lopetettiin hiilidioksidilla ja kuolema varmistettiin niskamurrolla. Lopetuksen jälkeen hiirten vatsa avattiin ja paksusuoli poistettiin. Jos suolessa oli ulostetta, se poistettiin ja mikäli hiireltä ei ollut saatu ulostenäytettä peräaukosta, otettiin näyte suolen sisällä olleesta ulosteesta. Suolen verisyyttä, eli punaisuutta arvioitiin visuaalisesti avauksen yhteydessä asteikolla 0-3. Lopetuspäivän ulosteen verisyyden ja koostumuksen sekä paksusuolen punaisuuden perusteella laskettiin ryhmille tulehduuspisteindeksi. Paksusuoli mitattiin digitaalisella työntömitalla ja ulosteen poistamisen jälkeen suoli punnittiin analyyysivaa'alla ja säilöttiin 4 % formaldehydiin. Pidemmän testiajan hiiret punnittiin ja tarkastettiin normaalisti. Kontrolliryhmän vesipullo ja testiaineryhmien DSS-pullot vaihdettiin uusiin. Häkkeihin vaihdettiin myös kuivikkeet ja pesämateriaalit. Kahden vuorokauden kuluttua pidemmän testiajan, eli seitsemän vuorokauden, hiiret lopetettiin ja tutkittiin samoin kuin lyhyemmän testiajan hiiret.

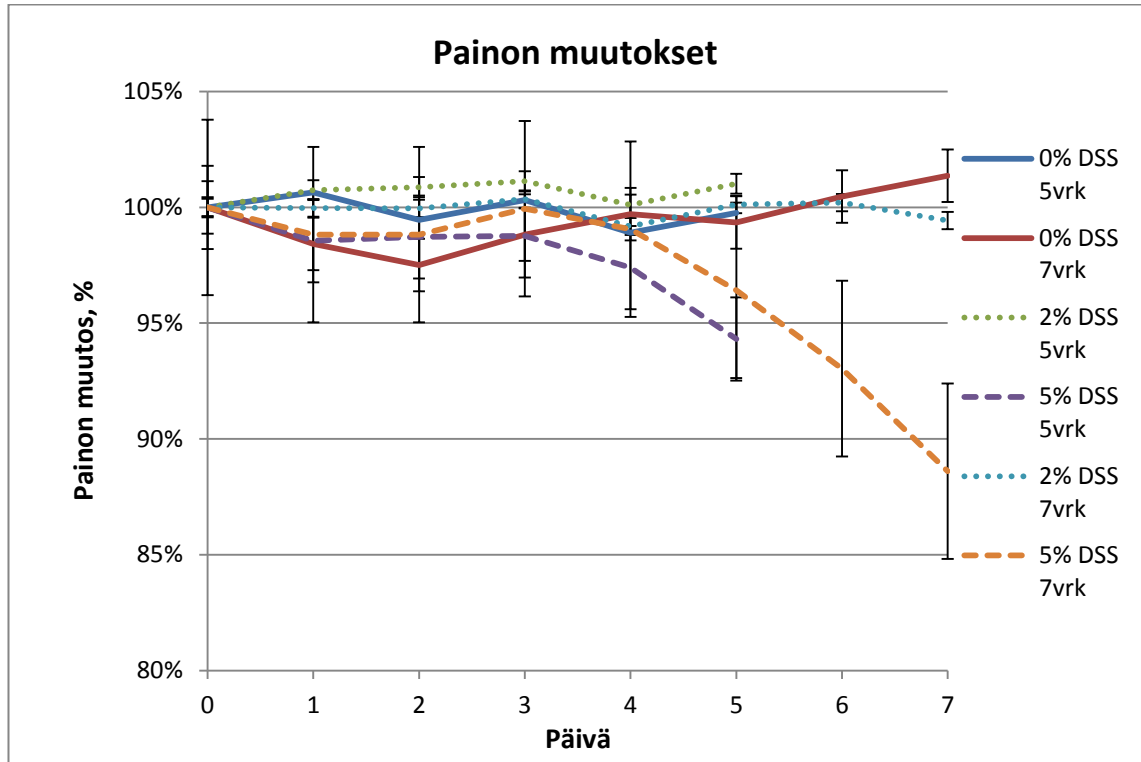


Kuva 2. Terve ja tulehtunut paksusuoli. Ylempänä terve suoli ja normaaleja ulostepapanoita. Alempana tulehtunut suoli. Copyright Toxis Ltd. Oy.

4 TULOKSET

4.1 Painonkehitys

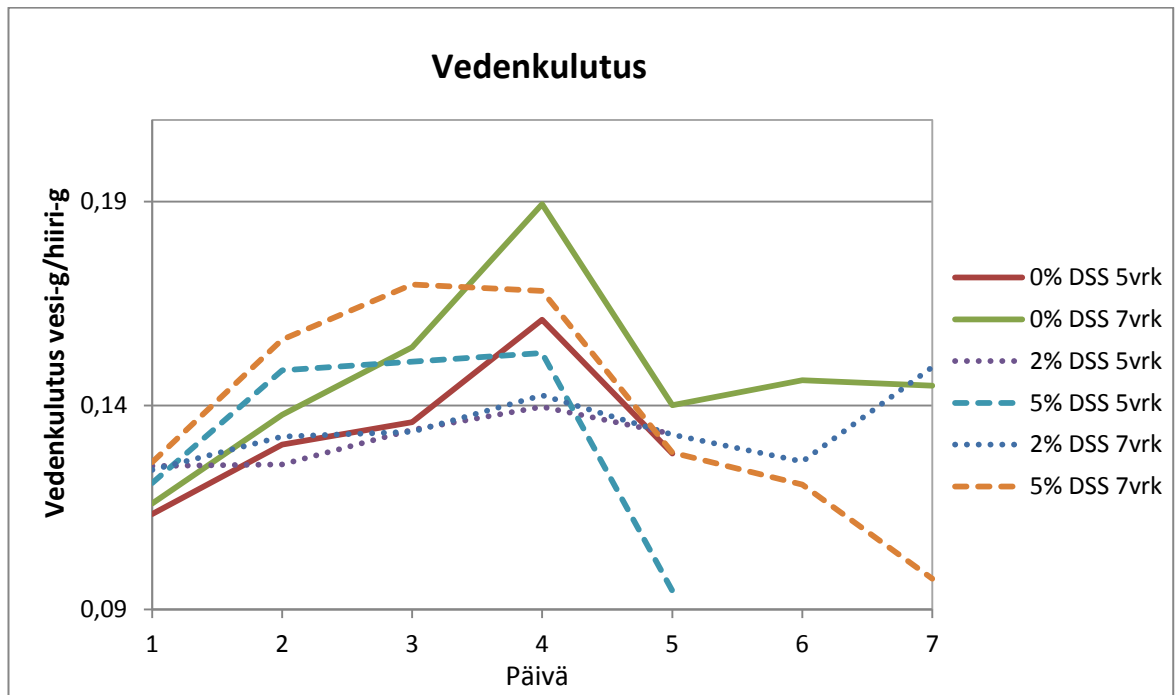
Kuviossa 1. on esitetty eri testiryhmien painonmuutos prosentuaalisena muutoksena kokeen alusta.



Kuvio 1. Painon muutokset. Hiiriryhmien painonkehitys testiaikana. Keskihajonta merkittynä käyrille.

4.2 Vedenkulutus

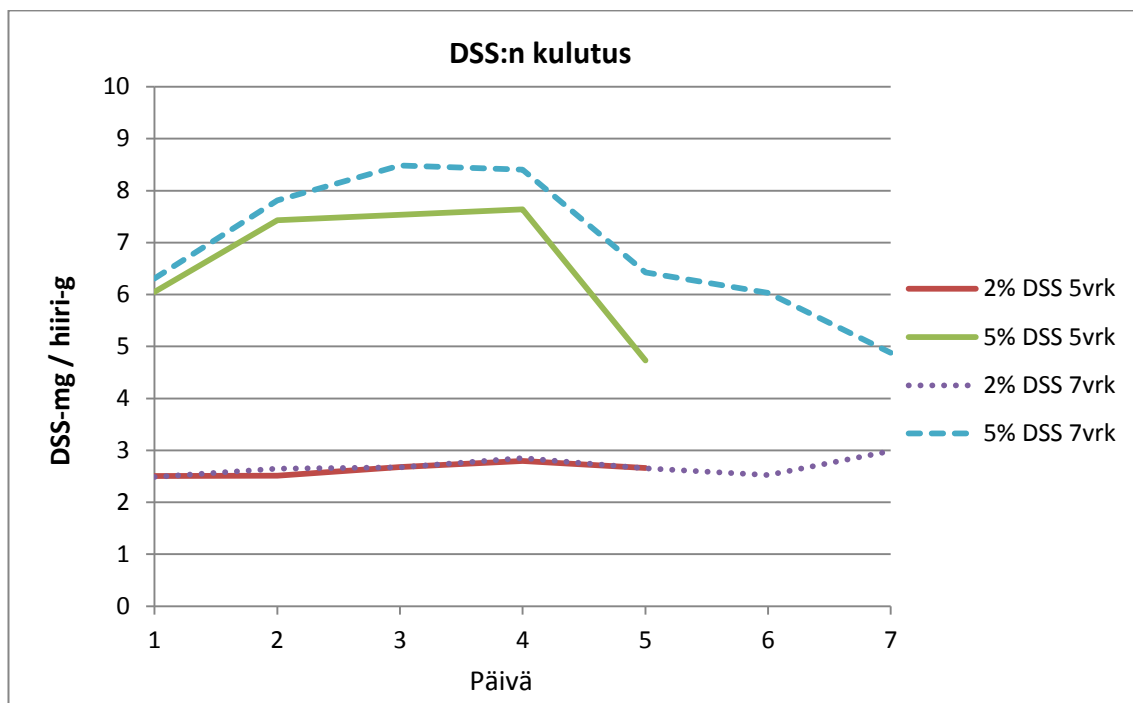
Vedenkulutus mitattiin häikeittäin. Kuviossa 2. esitetään vedenkulutus suhteessa hiirien painoon.



Kuvio 2. Vedenkulutus. Vedenkulutus on esitetty ryhmittäin vesigrammoina hiirigrammaa kohden.

4.3 DSS:n kulutus

Kuviossa 3. on esitetty testiaineen kulutus mg:oina hiirten painon suhteen.



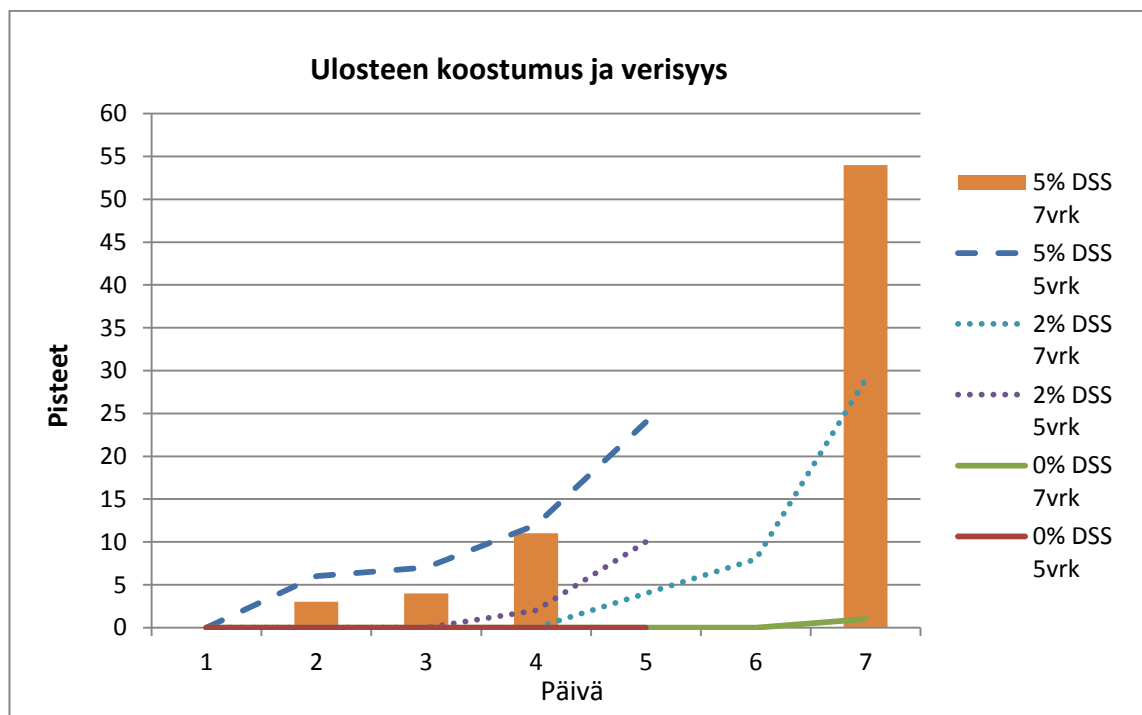
Kuvio 3. DSS:n kulutus. Kulutus on esitetty mg:oina hiirigrammaa kohden.

4.4 Tulehdusoireet

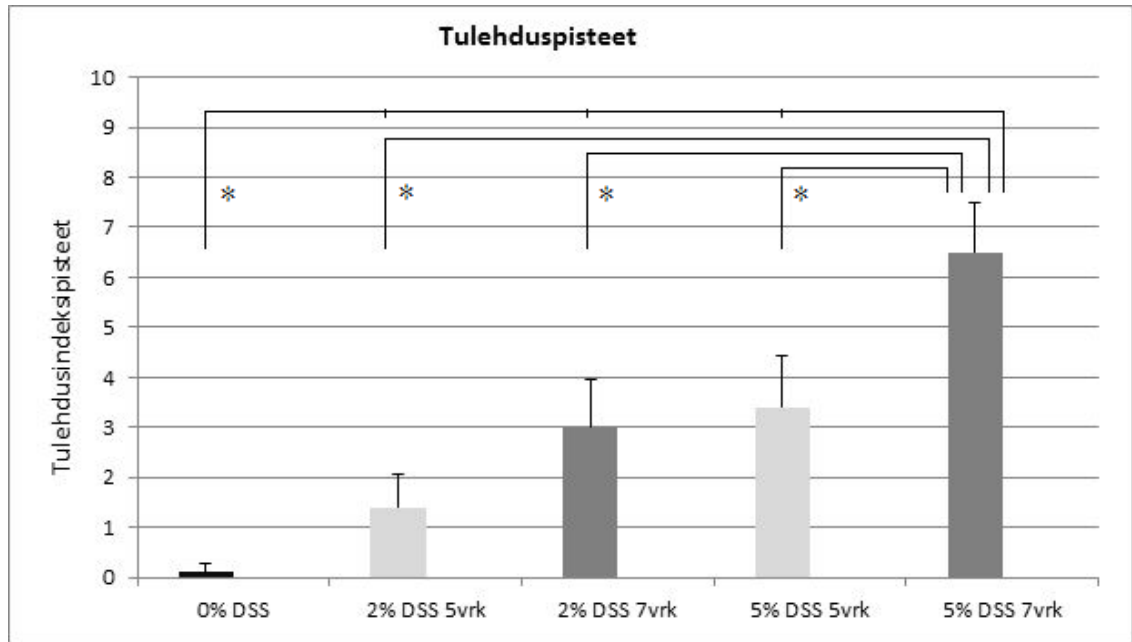
Kuviossa 4. on esitetty tulehduksen voimakkuuden kasvua kokeen aikana. Lopetuspäivän havaintojen perusteella lasketut tulehduspisteindeksit on esitetty ryhmittäin Kuviossa 5. Indeksiksi laskettiin laskemalla kunkin ryhmän ulosteen koostumuksen (0-3), ulosteen verisyyden (0-3) ja suolen punaisuuden (0-3) pisteet yhteen ja jakamalla tulos hiirten määrällä.

$$\frac{\sum_n \text{koostumus pisteet} + \sum_n \text{verisyys pisteet} + \sum_n \text{punaisuus pisteet}}{n} = \text{indeksi}$$

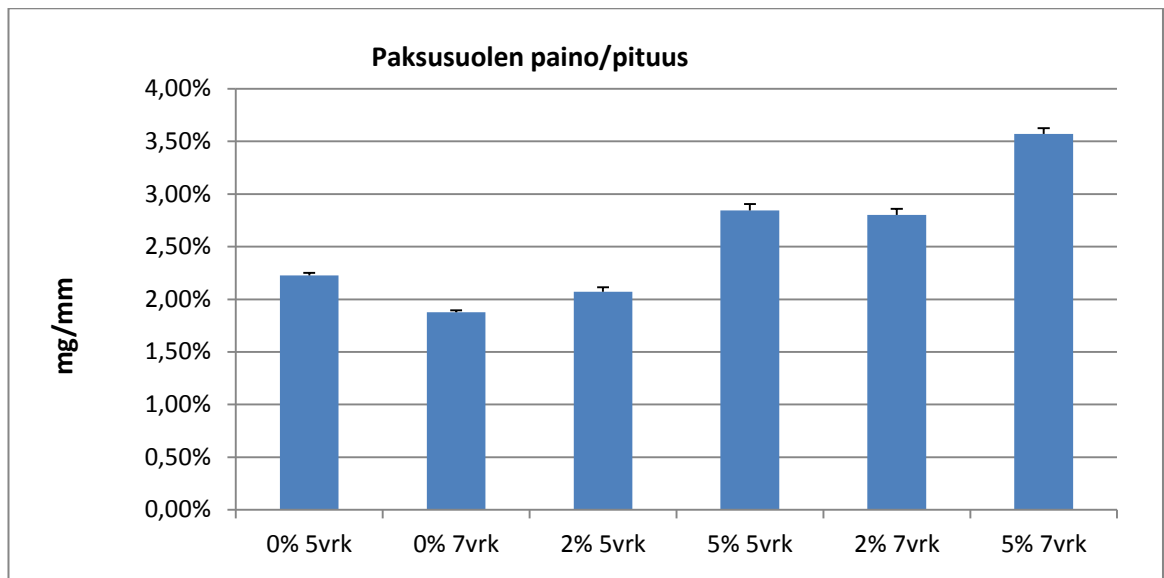
Hiirten paksusuolten paino-pituussuhde on esitetty Kuviossa 6.



Kuvio 4. Ulosteen yhteenlasketut pisteet. Ulosteen koostumuksen ja verisyyden pisteet on laskettu yhteen ryhmittäin. 5 % DSS 7 vrk:n ryhmältä ei saatu näytteitä päivinä 5 ja 6.



Kuvio 5. Lopetuspäivän tulehdusindeksi. Lopetuspäivän ulosteen koostumuksen ja verisyyden sekä paksusuolen punaisuuden mukaan laskettu tulehdusindeksi. (* $p < 0,01$)



Kuvio 6. Paksusuolen pituus-painosuhteet. Eri ryhmien keskimääräiset paksusuolen pituuden ja painon suhteet prosentteina lopetuspäivänä.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

5.1 Painonkehitys

Kontrolliryhmien ja 2 %:n testiaineryhmien paino ei juurikaan muuttunut testin aikana. Sen sijaan 5 %:n testiryhmien paino lähtee jyrkkenevään laskuun kolmannen testipäivän jälkeen. Kontrolliryhmien ja 5 %:n DSS -ryhmien suhteen painonmuutokset korreloivat hyvin tulehduksen voimakkuutta kuvaavaan tulehdusindeksiin, suhteet esitetty alla, Taulukko 2. 2 %:n DSS -ryhmillä havaittiin tulehdusreaktioita mutta paino ei silti kokeen aikana pudonnut.

Taulukko 2. Painonlaskun ja tulehdusindeksin suhteet.

Ryhmät	Painonlasku	Tulehdusindeksi
5% DSS 5vrk	5,7 %	3,4
5% DSS 7vrk	11,4 %	6,5

5.2 Vedenkulutus

Vedenkulutuksessa näkyy vertailuryhmillä suuri vedenkulutuksen nousu neljännen päivän kohdalla. Vedenkulutuksen näennäinen kasvu ei kuitenkaan vaikuttanut mitenkään eläinten painoon. Nousu johtuikin todennäköisesti siitä, että eläintenhoitajat lisäsivät neljännen päivän aamuna hälleihin rehua ja samalla siirtelivät ja heiluttivat juomapulloja. Pelkkää vettä saaneilla hiirillä oli normaali, suurempi vesipullo, josta tippuu vettä läpi aina koskettaessa. DSS:ää saaneilla hiirillä oli pienemmät pullo, joissa veden tipottelua tapahtui paljon vähemmän. Rehujen lisäys siis tärsytti kaikkia hällejä yhtä paljon, mutta suurista pulloista valui vettä paljon enemmän hällekin pohjalle kuin muista pulloista ja tämä tekee neljänteen päivään suurehkon virheen standardiryhmien vedenkulutukseen. Ongelman poistamiseksi täytyy jatkossa kaikkien hällekin pullojen olla samanlaiset.

Jos kyseinen piikki oletetaan havaintovirheeksi, niin ainut merkittävä muutos on 5 %:n testiaineryhmien neljännestä päivästä alkanut vedenkulutuksen lasku. Tämä korreloi hyvin myös painonkehityksen ja tulehdusoireiden kanssa, koska normaalisti eläinten hyvinvoinnin heiketessä myös vedenkulutus laskee.

5.3 DSS:n kulutus

5 %:n testiaineryhmien vedenkulutus laski viimeisinä päivinä rajusti. Koska testiaine annettiin juomaveden mukana, myös testiaineen kulutus laski. Tulehdusoireet kuitenkin voimistuivat kokeen loppuun asti. 2 %:n testiaineryhmien vedenkulutus sen sijaan pysyi tasaisena koko kokeen ajan ja 7 vrk:n ryhmällä jopa nousi viimeisenä päivänä. Tulehdusoireet olivat kuitenkin huomattavasti pienemmät kuin 5 %:n ryhmillä. Kuviossa 3. on esitetty testiaineen kulutus päivittäin 5 %:n ja 2 %:n ryhmillä. Vaikka 5 %:n ryhmien testiaineen kulutus laski viimeisinä päivinä, on kulutus silti huomattavasti suurempaa kuin 2 %:n hiirillä, joka selittää tulehdusoireiden erilaisuutta.

5.4 Tulehdusoireet

DSS:n aiheuttamat tulehdusoireet olivat tutkimuksen pääasiallinen kiinnostuksen kohde. 5 %:n DSS-ryhmillä ensimmäiset tulehdusoireet havaittiin ulosteen muutoksista toisena testipäivänä. Tulehdus eteni seuraavat kaksi päivää verkkaisesti, kunnes viidentenä päivänä tulehdus voimistui nopeasti. Vain harvalta eläimeltä saatiin ulostenäytteitä lainkaan mutta peräaukon ympäristön likaisuus ja verisyys kertoi voimakkaasta ripulista. Kuudentena ja seitsemäntenä päivänä oireet edelleen voimistuivat. Joidenkin hiirten paino laski hälyttävän nopeasti ja ne olisi kokeen vielä jatkuessa täytynyt lopettaa eettisten säännösten perusteella. 2 %:n DSS-ryhmillä ensimmäiset tulehdusoireet havaittiin kolmantena ja neljäntenä päivänä. 5 vrk:n ryhmällä tulehdus ei ehtinyt voimistua mutta 7 vrk:n ryhmän ulosteen perusteella lasketut tulehduspisteet yli kolminkertaistuivat viimeisenä päivänä. 2 %:n DSS ja 5 %:n DSS ryhmien

välillä oli merkittävä ero. 5 %:n DSS ryhmien ulosteesta määritetyt tulehduspisteet olivat noin kaksinkertaiset vastaaviin 2 %:n ryhmiin verrattuna. Kokonaistulehdusindeksi laskettiin lopetuspäivän ulostehavaintojen ja paksusuolen punaisuuden pisteiden perusteella. Kuviossa 5. esitetyt tulehdusindeksin pisteet noudattavat trendiä, jossa 2 %:n ryhmällä on puolet 5 %:n ryhmien pisteistä ja 5 vrk:n ryhmien pisteet ovat puolet 7 vrk:n ryhmien pisteistä.

Paksusuolen paino/pituus-suhde kasvoi DSS:n vaikutuksesta, Kuvio 6. Vertailuryhmien keskiarvo on tasan 2 %. 5 vrk:n testiajalla ei 2 %:n DSS-ryhmällä paksusuolen paino pituuden suhteen ole vielä juurikaan kasvanut, mutta 7 vrk:n ryhmällä on suhde kasvanut 2,75 %:iin. 5 %:n DSS ryhmällä 5 vrk:ssa suhde oli kasvanut 2,75 %:iin ja 7 vrk:ssa 3,50 %:iin. Ryhmien erot noudattavat samaa tulehdusindeksistä tuttua trendiä.

5.5 Loppupäätelmät

DSS:llä saadaan indusoitua hiireen IBD:tä vastaava suolistotulehdus. 2 %:n DSS pitoisuus ei ollut riittävä, vaan tulevilla kokeissa täytyy käyttää 5 %:n pitoisuutta annostelun kestäessä 5 tai 7 vuorokautta. Tulehdus voimistui neljäntenä päivänä, joten tuolloin myös hoitavan testiaineen annostelu tulisi aloittaa, jos kyseessä on lääkkeen tehon osoittaminen. Jos testattavan aineen vaikutusten ilmentyminen kestää useampia päiviä, voi olla, että DSS pitoisuutta täytyy laskea, jotta hiiret eivät kuole kesken tutkimuksen.

Tämän tutkimuksen perusteella saatiin validoitua krooninen paksusuolen tulehdusmalli löytämällä sopiva juomaveden DSS-pitoisuus sekä indusointiaika.

Lähdeluettelo

- ¹ Lääkelaki, 4.11.2005/853 Saatavilla WWW-muodossa:
<http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1987/19870395>
- ² Oja, S. S. (2010) Onko eläimillä oikeuksia? : eläinkoelainsäädännön kehitys ja nykytila. Väitöskirja. Oikeustieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto, Suomi.
- ³ Laki koe-eläintoiminnasta, 62/2006, 20.01.2006. Saatavilla WWW-muodossa:
<http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2006/20060062>
- ⁴ Direktiivi 2010/63/EU, 20.10.2010. Saatavilla WWW-muodossa:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:FI:PDF>
- ⁵ Nevalainen T., ym. (1996). Rottia, tutkijoita, tuloksia. Finlas ry, Suomi
- ⁶ Gad, S. C. (2006). Animal Models in Toxicology (Drug and Chemical Toxicology) Second Edition, Informa Healthcare
- ⁷ Lappalainen, M. (2008). Genetic variation and clinical manifestations in inflammatory bowel disease. Academic dissertation. Department of Medicine and Research Program for Molecular Medicine, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki, Finland
- ⁸ Käypä hoito, Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Gastroenterologiyhdistys ry:n ja Crohn ja Colitis ry:n asettama työryhmä
- ⁹ Ashorn M., Iltanen S., Kolho K.-L., Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 2009;125(17):1849-56
- ¹⁰ Koulu, M., ym. (2001). Farmakologia ja toksikologia, 6. painos. Medicina Kustannus, Suomi
- ¹¹ Haapamäki, J. (2011). Health-related quality of life, symptoms and comorbidity in inflammatory bowel disease. Academic dissertation. Faculty of Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Helsinki, Finland
- ¹² Boon R. J. (1985) Studies with Temocillin in a Hamster Model of Antibiotic-Associated Colitis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: Vol 27, Nro 6, s. 980-981
- ¹³ Bamba S., ym. (2011). The severity of dextran sodium sulfate-induced colitis can differ between dextran sodium sulfate preparations of the same molecular weight range. Digestive Diseases and Sciences: Vol 57, Nro 2, s. 327-334 [Online, viitattu 01.12.2011]. Saatavilla WWW-muodossa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901260>
- ¹⁴ Sainathan S, ym. (2011). Toll-like receptor-7 ligand imiquimod induces type I interferon and antimicrobial peptides to ameliorate dextran sodium sulfate-induced acute colitis. Inflammatory Bowel Diseases: Sep 26 [Online, viitattu 01.12.2011]. Saatavilla WWW-muodossa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953855>
- ¹⁵ Sanada Y., ym. (2011) Therapeutic effects of novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist W-061 in murine DSS colitis. PLoS ONE : 6(9) [Online, viitattu 01.12.2011]. Saatavilla WWW-muodossa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21931623>
- ¹⁶ Beong L. (2011). *Coriolus versicolor* Suppresses Inflammatory Bowel Disease by Inhibiting the Expression of STAT1 and STAT6 Associated with IFN-γ and IL-4 Expression. Phytotherapy Research: Vol 25, Issue 8, s. 1257–1261 [Online, viitattu 01.12.2011]. Saatavilla WWW-muodossa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796702>

¹⁷ Harlan laboratories [Online, viitattu 01.12.2011]. Saatavilla WWW-muodossa: http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/laboratory_animal_diets/teklad_natural_ingredient_diets/teklad_global_diets/global_rodent_diets/teklad_global_rodent_diet_16_protein_2016.hl#Macronutrient_Information

¹⁸ Laroui, H., ym. (2012). Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon. PLoS One. 2012;7(3) Department of Biology, Center Diagnostics and Therapeutics, Georgia State University, Atlanta, Georgia, United States of America

Hemocult tulokset lopetuspäivänä				Kategoria		Visuaaliset havainnot lopetuspäivänä
#	A	B	Keskiarvo	0	Negatiivinen	
1	1	0,5	0,75	0,5	Heikko positiivinen	0
2	0	0	0	1	Positiivinen	0
3	0	0	0		Ristiriita	0
4	0	0	0			0
5	0	0	0			0
6	0	0	0			0
7	0	0	0			0
8	0	0	0			0
9	0	0	0			0
10	0	0	0			0
11	0	0	0			0
12	1		1			1
13	0	0,5	0,25			0
14	0	0,5	0,25			0
15	0,5	0,5	0,5			0
16	0	0	0			0
17	0,5	0	0,25			0
18	1	1	1			0
19	0	1	0,5			0
20	1		1			1
21	0	0,5	0,25			0
22	0	0	0			1
23	1	1	1			2
24	1	1	1			3
25	1	1	1			0
26	1	1	1			1
27	0	1	0,5			1
28	1	1	1			3
29	0	0,5	0,25			1
30	1	1	1			2
31	0	0,5	0,25			0
32	1	1	1			3
33	1	0	0,5			1
34	1	0,5	0,75			2
35	1	0,5	0,75			2
36	0,5	1	0,75			2
37	1	1	1			3
38	0	1	0,5			1
39						2
40	1	1	1			2
41	1		1			3
42	1	1	1			3
43	1	1	1			1
44						3
45	1		1			3
46	1	1	1			3
47	1	1	1			2
48	1		1			3
49	1		1			2
50	1	1	1			3